



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT

EIDGENÖSSISCHES AMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

## PATENTSCHRIFT

Veröffentlicht am 1. Juni 1949

Klasse 116h

Sectie:

Gesuch eingereicht: 16. Dezember 1946, 19 Uhr. — Patent eingetragen: 15. Januar 1949.  
(Priorität: Ungarn, 28. Dezember 1945.)

## HAUPTPATENT

Dr. Albert Szent-Györgyi, Dr. Kálmán Laki, Dr. Mihály Gerendás  
und Servita Gyógyszergyár és Vegyipari RT., Budapest (Ungarn).

## Verfahren zur Herstellung von Thrombin aus Blut.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Thrombin aus Blut. Da das Thrombin bekanntlich blutgerinnende Wirkung hat, so kann es in der Therapie vielfach, z. B. bei chirurgischen Operationen verwendet werden, wobei man beinahe blutlos arbeiten und dadurch chirurgische Eingriffe in großem Maße fördern kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Blut in eine das Gerinnen verhindernde Lösung einführt, dann diese Mischung mit kalziumarmem Wasser mindestens auf das 5fache Volumen verdünnt, sodann durch Zugabe einer organischen Säure eine Ausfällung bewirkt, wobei man den  $pH$ -Wert der Lösung auf Grund vorangehender Proben auf einen Wert einstellt, bei welchem ein maximaler Niederschlag entsteht, daß man sodann den abgesonderten, das Prothrombin des Blutes enthaltenen Niederschlag in einer kalziumfreien Salzlösung mit einem  $pH$  von mindestens 7,2 auflöst und zwecks Umwandlung des Prothrombins in Thrombin mit einer Kalziumsalzlösung und einem Thrombokinaspräparat zusammenbringt, wobei man außerdem noch mindestens einen Stoff zugibt, welcher der Abnahme der Menge des entstandenen Thrombins entgegenwirkt, worauf man schließlich das gebildete Thrombin mit Hilfe eines die Wirksamkeit desselben höchstens wenig beeinträchtigenden Fällungsmittels ausfällt,

von der Flüssigkeit abtrennt, wäscht und trocknet.

Als Ausgangsstoff wird zweckmäßig tierisches Blut, z. B. Rinder-, Schweine- oder Pferdeblut verwendet.

Das Verfahren kann beispielsweise wie folgt ausgeführt werden:

Frisch gewonnenes Blut wird sofort in eine das Gerinnen des Blutes hindernde Lösung, z. B. in eine 2%ige Natriumoxalat-lösung, eingeführt, deren Menge  $\frac{1}{10}$  der Blutmenge ausmacht. Die Formelemente des Blutes, hauptsächlich Blutkörperchen, können z. B. durch Zentrifugieren abgesondert und nur das Plasma weiter verarbeitet werden; diese Absonderung kann aber auch unterbleiben, so daß man mit vollem Blut weiter arbeitet. Da die Anwesenheit von Ca-Jonen den Erfolg des Verfahrens beeinträchtigt, wird die erhaltene Flüssigkeit mit kalziumarmem Wasser, also z. B. mit Oxalat keinen Niederschlag gebendem Wasser, zweckmäßig mit Regenwasser oder Schneewasser oder destilliertem Wasser, auf mindestens auf das 5fache Volumen, z. B. auf das 10 bis 15fache, verdünnt. Dann folgt eine Ausfällung durch Zugabe einer organischen Säure, am zweckmäßigsten Essigsäure, wobei die Lösung durch vorangehende Proben auf einen optimalen  $pH$ -Wert eingestellt wird, welcher vom verwendeten Blut die größte Menge Niederschlag liefert. In diesem Niederschlag ist nur

der Vorstoff des blutgerinnenden Stoffes, das sogenannte Prothrombin anwesend. Bezüglich der Produktion des Niederschlages hängt der optimale pH-Wert in großem Maße von der Herkunft des anzuwendenden Blutes, vom Alter und der Rasse des Tieres usw. ab. Es wurden z. B. durch Anwendung von organischen Säuren, z. B. Essigsäure, vom pH 4,8 bis 5,8 gute Resultate erzielt. Der erhaltene Niederschlag wird z. B. durch Zentrifugieren abgesondert, dann in einer kalziumfreien, schwachbasischen Salzlösung vom pH mindestens 7,2, z. B. in kalziumfreier Ringerscher Lösung, aufgelöst. Sodann wird unter Zugabe einer Kalziumsalzlösung und irgendeines Thrombokinaspräparates das in der Lösung anwesende Prothrombin in Thrombin überführt. Das Ende der Umwandlung wird von Zeit zu Zeit durch Entnahme von Proben festgestellt. Während der Versuche wurde beobachtet, daß sich die Menge des entstandenen Thrombins ohne Anwendung von besonderen Vorsichtsmaßregeln stark vermindert, namentlich teilweise durch Adsorption und teilweise durch die Einwirkung eines das Thrombin inaktivierenden Fermentes. Diese Nachteile werden dadurch vermieden, daß zur Verhinderung der Adsorption des Thrombins der Lösung vor Zugabe des Kalziumsalzes irgendein die Lipoide lösendes Mittel, zweckmäßig Chloroform, hinzugegeben wird und zur Eliminierung der fermentativen Inaktivierung in Anwesenheit solcher Stoffe gearbeitet wird, welche zur Bindung von Metallionen, z. B. Eisenionen befähigt sind, also z. B. mit denselben undissoziierte komplexe Verbindungen bilden, da zur Wirksamkeit des inaktivierenden Fermentes nach unseren Feststellungen die Anwesenheit von Metallionen unentbehrlich ist. Als solcher Stoff hat sich das  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dipyridil als sehr vorteilhaft erwiesen, das schon in Spuren die fermentative Spaltung des Thrombins verhindert.

Das Gerinnsel des etwa gebildeten Fibrins wird nach Beendigung der Thrombinbildung entfernt und dann das Thrombin mit einem die Wirksamkeit desselben nicht oder

höchstens wenig beeinträchtigenden Fällungsmittel, z. B. einem Keton, aus der Lösung gefällt. Es hat sich die Fällung mit Aceton, z. B. mit zweifacher Menge, in der Umgebung von 0° C als zweckmäßig erwiesen.

Das erhaltene Thrombin liegt nach dem üblichen Trennen von der Flüssigkeit, Waschen und Trocknen als ein verwendungsfertiges trockenes Pulver vor. Arbeitet man unter den angegebenen optimalen Bedingungen, so ist eine Ausbeute von 75—80% Thrombin leicht zu erreichen. Die Wirksamkeit des Präparates kann gesteigert werden, wenn das erhaltene Pulver in destilliertem Wasser gelöst, der unlösliche Teil entfernt und die Fällung mit Hilfe eines Fällungsmittels, z. B. mit kaltem Aceton, sowie die Waschung und Trocknung, wie beschrieben, wiederholt wird.

Aus dem trockenen Pulver können Lösungen in destilliertem Wasser oder Emulsionen hergestellt und dieselben, in Ampullen eingeschmolzen, in Verkehr gebracht werden. Ein solches Präparat kann, wenn es unter den angegebenen Bedingungen hergestellt wurde, gut aufbewahrt werden. Zur Konservierung der ampullierten Substanz ist die Anwesenheit eines Lipoidlösungsmittels, zweckmäßig Chloroform, und ferner eines die Zersetzung des Thrombins verhindernden Stoffes, insbesondere von  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dipyridil, notwendig.

#### PATENTANSPRUCH:

Verfahren zur Herstellung von Thrombin aus Blut, dadurch gekennzeichnet, daß man Blut in eine das Gerinnen verhindernde Lösung einführt, dann diese Mischung mit kalziumarmem Wasser mindestens auf das 5fache Volumen verdünnt, sodann durch Zugabe einer organischen Säure eine Ausfällung bewirkt, wobei man den pH-Wert der Lösung auf Grund vorangehender Proben auf einen Wert einstellt, bei welchem ein maximaler Niederschlag entsteht, daß man sodann den abgesonderten, das Prothrombin des Blutes enthaltenden Niederschlag in einer kalziumfreien, schwachbasischen Salzlösung mit einem pH

von mindestens 7,2 auflöst und zwecks Umwandlung des Prothrombins in Thrombin mit einer Kalziumsalzlösung und einem Thrombokinasepräparat zusammenbringt, wobei man außerdem noch mindestens einen Stoff zugibt, welcher der Abnahme der Menge des Thrombins entgegenwirkt, worauf man schließlich das gebildete Thrombin mit Hilfe eines die Wirksamkeit desselben höchstens wenig beeinträchtigenden Fällungsmittels ausfällt, von der Flüssigkeit abtrennt, wäscht und trocknet.

#### UNTERANSPRÜCHE:

1. Verfahren nach Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, daß man aus dem Blut die Formelemente absondert und dann das Blutplasma weiter behandelt.

2. Verfahren nach Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, daß man, um der Abnahme der Menge des Thrombins entgegenzuwirken, vor Zugabe der Kalziumsalzlösung ein Lipoidlösungsmittel zusetzt, welches die Bindung des Thrombins durch Adsorption verhindert.

3. Verfahren nach Unteranspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Lipoidlösungsmittel Chloroform verwendet.

4. Verfahren nach Patentanspruch und den Unteransprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß man, um der Abnahme der Menge des Thrombins entgegenzuwirken, außerdem einen Stoff zusetzt, welcher die fermentative Zerstörung des Thrombins verhindert.

5. Verfahren nach Patentanspruch und den Unteransprüchen 2—4, dadurch gekennzeichnet, daß man  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dipyridil verwendet.

6. Verfahren nach Patentanspruch und den Unteransprüchen 2—5, dadurch gekennzeichnet, daß man das getrocknete, pulverförmige Thrombin in destilliertem Wasser löst und nach Abtrennen des unlöslichen Rückstandes das Thrombin erneut durch Zugabe von Fällungsmitteln ausfällt, die Flüssigkeit abtrennt, wäscht und trocknet.

Dr. Albert Szent-Györgyi.

Dr. Kálmán Laki.

Dr. Mihály Gerendás.

Servita Gyógyszergyár és Vegyipari RT.

Vertreter: Naegeli & Co., Bern.

No. 259254

No. 259254

SWISS CONFEDERATION  
FEDERAL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
**PATENT**

Published June 1, 1949

Class **116h**

Application Filed: December 16, 1946, 7:00 p.m. — Patent Registered: January 15, 1949  
(priority: Hungary, December 28, 1945)

**PRINCIPAL PATENT**

Dr. Albert Szent-Györgyi, Dr. Kálmán Laki, Dr. Mihály Gerendás  
and Servita Gyógyszergyár és Vegyipari RT Budapest (Hungary)

**Method for Manufacturing Thrombin from Blood**

The invention relates to a method for manufacturing thrombin from blood. Since thrombin is known to have a blood-coagulating effect, it can often be used in treatment, for example in surgery, making it possible to operate in a nearly blood-free environment and thus considerably assisting operations.

The method according to the invention is characterized by the fact that blood is added to a solution that prevents coagulation, then this mixture is diluted with water low in calcium to a volume at least five times greater, so that when an organic acid is added, precipitation occurs, with the pH of the solution being adjusted on the basis of previous tests to a value at which maximum precipitation occurs, [characterized by the fact] that the separated precipitate, containing the prothrombin from the blood, is dissolved in a calcium-free salt solution with a pH of at least 7.2, and is then mixed with a calcium salt solution and a thrombokinase preparation to convert the prothrombin into thrombin, with at least one other material being added to counteract the decrease in the quantity of resultant thrombin, and with the thrombin formed finally being

precipitated out with the aid of a precipitating agent that has as little adverse influence on the effectiveness of said thrombin as possible, after which the thrombin is separated from the fluid, washed, and dried.

Advantageously, animal blood — for example, cattle, pig, or horse blood — is used as the starting material.

The process can be performed as follows for example:

Freshly collected blood is introduced immediately into a solution that retards the coagulation of the blood, for example, a 2% sodium oxalate solution, whose volume amounts to 1/10th of the volume of the blood. The formed elements of the blood, primarily corpuscles, can be separated by centrifuging, for example, and only the plasma is processed further; this separation step can be omitted, however, so that the process continues with whole blood. Since the presence of calcium ions adversely affects the success of the method, the resultant fluid is diluted with water low in calcium, for example, with water that does not produce a precipitate with oxalate, advantageously with rain water or snow water or distilled water, to at least five

times the volume, for example, 10 to 15 times the volume. Then precipitation is caused by adding an organic acid, most advantageously acetic acid, and the solution is then adjusted on the basis of previous tests to an optimum pH that delivers the largest volume of precipitate from the blood used. In this precipitate, only the precursor of the blood-coagulating material, the so-called prothrombin, is present. As far as production of precipitate is concerned, the optimum pH depends largely upon the source of the blood used, the age and the species of the animal, etc. By using organic acids, for example, acetic acid, with a pH of 4.8 to 5.8, good results are obtained. The resultant precipitate is separated, for example, by centrifuging, then dissolved in a calcium-free, slightly basic salt solution with a pH of at least 7.2, for example, in calcium-free Ringer solution. Then, by adding a calcium salt solution and some thrombokinase preparation, the prothrombin present in the solution is converted to thrombin. The degree of conversion is checked from time to time by taking samples. During the test, observations are conducted to ensure that the quantity of resulting thrombin is reduced sharply without using special safety measures, namely, partly by adsorption and partly by the action of an enzyme that inactivates the thrombin. These disadvantages are avoided by virtue of the fact that in order to prevent adsorption of thrombin from the solution prior to adding the calcium salt, a medium that dissolves the lipids, advantageously chloroform, is added, and in order to eliminate enzymatic inactivation, the process is conducted in the presence of substances that are capable of binding metal ions (for example, iron ions), in other words, forming nondissociated complex compounds with them, since the effectiveness of the inactivating enzyme, according to our findings, requires the presence of metal ions. The  $\alpha$ ,  $\alpha'$  dipyridyl has proven very advantageous as such a substance, which even

in trace amounts prevents the enzymatic splitting of thrombin.

The clot of fibrin that forms is removed after thrombin formation is complete and then the thrombin together with a precipitant that does not influence the effectiveness thereof, or adversely affects it slightly at most, for example, a ketone, is precipitated from the solution. Precipitation with acetone, for example, with twice the amount, at temperatures of about 0°C, has proven advantageous.

After the usual separation from the fluid, washing, and drying, the thrombin obtained is in the form of a ready-to-use dry powder. If work is conducted under the stated optimum conditions, a yield of 75-80% thrombin is easily achieved. The effectiveness of the preparation can be increased if the powder obtained is dissolved in distilled water, the undissolved part is removed, and precipitation is repeated with the aid of a precipitating agent, for example, cold acetone, as well as washing and drying as described.

Solutions in distilled water or emulsions can be prepared from the dry powder and marketed, sealed in ampoules. Such a preparation, if manufactured according to the stated conditions, has a good shelf life. For preservation of the substance in the ampoules, the presence of a lipid solvent, advantageously chloroform, as well as a substance that prevents decomposition of the thrombin, especially  $\alpha$ ,  $\alpha'$  dipyridyl, is important.

## CLAIMS

Method for producing thrombin from blood, characterized by the fact that blood is placed in a solution that prevents clotting, then this mixture is diluted with low-calcium water to at least 5 times the volume, whereupon precipitation is induced by adding an organic acid, then the pH of the solution is adjusted on the basis of previous tests to a value at which maximum precipitation takes place, by the fact that the separated precipitate

containing the prothrombin from the blood is dissolved in a calcium-free, slightly basic salt solution with a pH of at least 7.2, and is mixed with a calcium salt solution and a thrombokinase preparation to convert the prothrombin into thrombin, whereupon at least one other substance is added that counteracts the loss of volume of the thrombin, and finally the thrombin formed is precipitated out with the aid of a precipitating agent that adversely affects the effectiveness of said thrombin to the slightest degree possible, separated from the liquid, then washed and dried.

#### SUBCLAIMS

1. Method according to the Claim, characterized by the fact that the formed elements are separated from the blood and the blood plasma is then treated further.

2. Method according to the Claim characterized by the fact that, in order to counteract the loss of volume of thrombin, before adding the calcium salt solution, a lipid solvent is added that prevents binding of the thrombin by adsorption.

3. Method according to Subclaim 2 characterized by the fact that chloroform is used as the lipid solvent.

4. Method according to the Claim and Subclaims 2 and 3 characterized by the fact that in order to counteract the loss of volume of the thrombin, another substance is added that prevents the enzymatic destruction of thrombin.

5. Method according to the Claim and Subclaims 2-4 characterized by the fact that  $\alpha$ ,  $\alpha'$  dipyridyl is used.

6. Method according to the Claim and Subclaims 2-5, characterized by the fact that the dried powdered thrombin is dissolved in distilled water and, after separation of the insoluble residue, is again precipitated by adding precipitating agents, the fluid is separated, and the thrombin is washed and dried.

Dr. Albert Szent-Györgyi

Dr. Kálmán Laki

Dr. Mihály Gerendás

Servita Gyógyszergyár és Vegyipari RT

Patent Attorneys: Naegeli & Company, Bern